

Rune Sörnäs

CEREBROSPINALVÄTSKANS CYTOLOGI

Med särskild hänsyn till multipel skleros och
cerebrovaskulära sjukdomstillstånd

LUND 1972

CEREBROSPINALVÄTSKANS CYTOLOGI

Med särskild hänsyn till multipel skleros och

cerebrovaskulära sjukdomstillstånd

AKADEMISK AVHANDLING

som med vederbörligt tillstånd av Medicinska fakulteten i Lund för vinnande av medicine doktorsgrad kommer att offentligen försvaras i föreläsningssal 1 i lasarettets i Lund centralblock onsdagen den 31 maj 1972 kl 9.15

av

RUNE SÖRNÄS

med.lic., Sm.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Från Neurologiska kliniken, Lunds universitet, Lund

Rune Sörnäs

CEREBROSPINALVÄTSKANS CYTOLOGI

Med särskild hänsyn till multipel skleros och
cerebrovaskulära sjukdomstillstånd

Lund 1972

Föreliggande arbete har möjliggjorts tack vare ekonomiskt
stöd från

Medicinska fakulteten i Lund

Stiftelsen MS-fonden och

Anders Österlunds Stiftelse



Printed in Sweden

Studentlitteratur

Lund 1972

INNEHÅLL

Inledning	6
Material	7
Metoder	7
Resultat	10
1. Celltyper och transformationsformer i cerebrospinalvätskan	10
2. Fagocytosförmåga hos cerebrospinalvätskans mononukleära celler	15
3. Utvinningsgrad, validitet och reliabilitet vid anrikning i sedimentkammare	15
Diskussion	17
4. Cerebrospinalvätskans cytologi:	
A. Under normala förhållanden hos vuxna	19
B. Under normala förhållanden hos spädbarn	20
C. Vid multipel skleros	21
D. Vid cerebrala infarkter och lobära hämatom	24
E. Vid intrakraniella blödningar i nyfödd- hetsperioden	33

Diskussion	34
Summary in English	42
Referenser	45

Föreliggande arbete utgör en sammanfattning av följande artiklar.

- I A new method for the cytological examination of the cerebrospinal fluid. J. Neurol. Neurosurg. Psychiat. 30:568-577, 1967
- II Transformation of mononuclear cells in cerebrospinal fluid. Acta Cytologica 15:545-552, 1971
- III The cytology of the normal cerebrospinal fluid. Acta Neurol. Scand. I tryck
- IV The cytology of the cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. Communic. Dept. Anat. Lund 3, 1972 (tillsammans med Haldo Östlund)
- V Cerebrospinal fluid after stroke. Arch. Neurol. I tryck, (tillsammans med Haldo Östlund och Ragnar Müller)

I texten kommer dessa artiklar att refereras med ovanstående romerska siffror.

I arbetet ingår dessutom opublicerade undersökningar rörande cerebrospinalvätskans cytologi hos nyfödda. Undersökningarna har utförts tillsammans med Nils Swenningsen och Stefan Aronsson.

En av de tidigaste metoderna för undersökning av celler i cerebrospinalvätskan (CSV) introducerades av Fuchs och Rosenthal (1) år 1904. Den visade sig emellertid ge begränsad cytologisk information och möjliggjorde identifiering endast av erythrocyter, mononukleära och polynukleära vita blodkroppar. Sedan dess har många olika metoder föreslagits i syfte att erhålla en enkel sådan för rutinmässig undersökning av CSV, men de allra flesta av dem har ej vunnit någon spridning eller fallit i glömska. (En detaljerad redovisning av cytologiska undersökningsmetoder ges i artikel I.)

Författaren har utarbetat en egen teknik för cytologisk undersökning av CSV. Metoden har rutinmässigt använts vid neurologiska kliniken, lasarettet i Lund sedan 1965.

I föreliggande arbete beskrivs denna metod och de resultat som erhållits vid undersökning av CSV under såväl normala som patologiska förhållanden. Särskilt intresse har ägnats den transformation av mononukleära celler, som äger rum, när de fäster på glas och vad detta innebär för bedömningen av morfologien. Vidare redovisas cellbilden i CSV vid cerebrala infarkter och lobära hämatom samt vid multipel skleros. I arbetet ingår även en studie över förekomsten av intrakraniella blödningar hos barn, som visat tecken på cerebral påverkan i anslutning till förlossningen.

M A T E R I A L

Materialet utgöres av CSV från patienter, som på grund av sjukdomar i centrala eller perifera nervsystemet undersökts vid neurologiska kliniken. Från infektionskliniken erhöles CSV från patienter med meningoencefalit och från barnkliniken CSV från barn, vilka företett symtom tydande på cerebral påverkan i neonatalperioden.

För undersökning av cytologien under normala förhållanden har använts 38 vuxna och 13 spädbarn. De vuxna patienterna hade psykiska och/eller somatiska symtom men ingen företedde kliniska tecken på neurologisk sjukdom. CSV-undersökning av spädbarnen motiverades av symtom, som skulle kunna bero på hjärnpåverkan, men som senare visade sig vara betingade av icke neurologiska orsaker.

M E T O D E R

Bestämning av totala antalet celler. Cerebrospinalvätskan (CSV) undersöktes omedelbart efter lumbalpunktion. En Jessenkammare (10 mm³), fylldes med obehandlad CSV. Efter ett par minuter räknades antalet röda blodkroppar, polynukleära och mononukleära celler i faskontrastmikroskop. Var CSV makroskopiskt blodig eller innehöll den stora mängder vita blodkroppar, som vid exempelvis meningoencefalit, utfördes cellräkningen i ljusmikroskop efter färgning av cellerna med metylrosanilin.

Differentialräkning. Vid cellrik CSV utfördes i Jessenkammaren en differentialräkning i faskontrastmikroskop på

förekomsten av makrofager, monocytära celler, lymfocyter, neutrofila och eosinofila leukocyter, celler som fagocyterat hämosiderin eller hämatoidin, s k siderofager, eller erythrocyter, s k erythrofager samt atypiska celler. Etthundra celler räknades. För beskrivning av morfologien vid faskontrastmikroskopi och nomenklatur: se nedan.

Innehåll CSV <100 vita blodkroppar utfördes differentialräkning efter anrikning av provet.

Anrikningsförfarande. Ca 0,7 ml CSV hälldes i en sedimenteringskammare bestående av en glascylinder, som fästs på ett objektglas medelst vaselin. Cellerna fick sedimentera en timme. Därefter uppsögs CSV försiktigt med en pasteurpipett men ca 0,2 ml lämnades kvar, varpå cylindern avlyftes. Preparatet undersöktes sedan i faskontrastmikroskop med vattenimmersionslins (obj. 40/0,75).

Färgning. Efter en timmes sedimentering avpipetterades ca 0,5 ml CSV, cylindern avtogs och en del av den resterande CSV uppsögs med spetsen av ett filtrerpapper. Därefter avskrapades vaselinringen noggrant och med spetsen av filtererpapperet i centrum av preparatet uppsögs återstoden av vätskan. Uppsugningen skedde kontinuerligt. På så sätt erhöles en snabb lufttorkning från periferin in mot centrum, vilket var förutsättningen för ett gott färgningsresultat. Preparatet färgades sedan ad modum May-Grünwald-Giemsa på samma sätt som vid färgning av lufttorkade utstryk av perifert blod.

Vid uttalad blodtillblandning av CSV sköljdes sedimentet med en kraftig stråle från den i pasteurpipetten uppsugna supernatanten efter det att cylindern avtagits. Därvid spolades merparten av röda blodkroppar bort. Kvar på glaset fanns ett

tunt lager av celler, som färgades på ovan beskrivet sätt efter lufttorkning.

Innehöll CSV stora mängder vita blodkroppar inskränktes sedimenteringen till några minuter, eftersom resultatet annars skulle ha blivit ett tjockt lager av celler, vilket omöjliggjort studium av enskilda celler.

Fagocytosförmåga. En droppe tusch tillsattes 1 ml CSV i sedimenteringskammaren. Efter en timmes sedimentering färgades sedimentet efter lufttorkning ad modum May-Grünwald-Giemsas och undersöktes i ljusmikroskop.

DNA-syntes. Centrifugerade CSV-celler odlades en timme i Carrelflaska vid 37°C i ett odlingsmedium, som tillsatts thymidin- H^3 . Lufttorkade sediment som fixerats tre minuter i metanol täcktes med Kodak AR 10 film. Autoradiografi utfördes ad modum Smith (2). Efter en veckas exponering färgades cellerna med Giemsas färglösning genom filmen.

Elektronmikroskopi. 30 ml CSV från en patient med multipel skleros anrikades genom centrifugering. Sedimentet förfixerades med glutaraldehyd och därefter med osmiumtetroxid. Efter tvättning med 25%-ig, 75%-ig och absolut aceton överfördes sedimentet till en plastkapsel (BEEM No. 00). Efter inbäddning i Vestopal färgades ultraturna snitt med blycitrat eller uranylacetat och undersöktes i en Philips EM 300.

Spektrofotometri. Hämoglobinhalten i CSV uppskattades genom bestämning av absorptionsvärdet kring 415 nm, där oxyhämoglobin har ett smalt maximum. Undersökningarna utfördes i en Beckman DE spektrofotometer. Normalvärde $\leq 0,02$ (3).

Statistiska metoder. Median och variationsbredd användes som mått på central tendens och spridning hos de variabler, som ej var normalfördelade.

Mediantest användes för påvisande av skillnader mellan grupper och Spearmans korrelationsmetod som mått på samvariation mellan variabler.

För att undersöka sambandet mellan cytologiska data och kliniska grupper utfördes en linjär diskriminantanalys efter en enkel variabeltransformation.

I övrigt hänvisas till metodbeskrivningar i varje enskild artikel.

R E S U L T A T

Celltyper och transformationsformer i cerebrospinalvätskan (I och II)

Faskontrastmikroskopi. I CSV förekommer huvudsakligen lymfocyter, monocytära celler, granulocyter och erythrocyter men stundom även celler i plasmacellsserien och tumorceller.

När lymfocyterna efter sedimenteringen når objektglaset fäster de dåligt. De utför ständigt små oscillerande rörelser och kan lätt fås att ändra läge genom att strömningar i CSV på olika sätt åstadkommes. Lymfocyterna varierar föga i form och utseende.

När cellerna studeras under sedimentationen kan två olika typer av monocytära celler urskiljas. Fritt svävande i CSV är de båda sfäriska. Den ena celltypen saknar pseudopodier, medan den andra typen företer pseudopodier i varierande grad och av olika utseende.

När de monocytära cellerna når objektglaset fäster de inom loppet av sekunder. En del celler bibehåller form och utseende oförändrade efter det att de fäst på glaset. Detta gäller främst de runda, kompakta monocytära celler, som ej har några pseudopodier. Hos dessa iakttages ej någon skillnad mellan kärna och cytoplasma.

Andra monocytära celler, företrädesvis de, som är utrustade med pseudopodier, plattas ut på glaset och ändrar ständigt form och utseende. Pseudopodierna flyter ut och tager kontakt med varandra, samtidigt som på platsen för den ursprungliga cellkroppen en kärna framträder allt skarpare. I den omgivande cytoplasman kan veckbildningar följas och ibland också uppkomst av vacuoler. Stundom minskar tätheten i kärnan och sammanfaller med cytoplasman och det är då ej möjligt att skilja kärna från cytoplasma. Dessa monocytära celler är oftast oregelbundet formade och ser därför "kantiga" ut. Vid en kontinuerlig observation av dessa celler iakttages hurusom många av dem skiftar form och utseende. På så sätt uppstår ett flertal sinsemellan mycket olika monocytära cellformer.

Somliga monocytära celler undergår en transformation till mycket stora celler, 50-100 μ m i diameter. Omvandlingen äger rum på två sätt.

De runda monocytära cellerna kan plötsligt omgivas av en svagt skönjbar utbredd cytoplasma, som är cirkelrunt

begränsad. Samtidigt som cytoplasman tättnar, minskar tätheten i den ursprungliga cellkroppen och långsamt framträder en tydlig kärna på dess plats med en distinkt kärnmembran och ett luckert kromatinnät. Den "nybildade" cytoplasman har under tiden gradvis blivit oregelbunden i sin kontur och avslutit kärnan excentriskt.

Det andra sätt, på vilket en transformation till en mycket stor cytoplasmalik cell uppstår, sker nästan explosionsartat. Från cellkroppen skjuter hastigt pseudopodier ut, som ökar i storlek och slutligen tar kontakt med andra pseudopodier så att ett cyncitium av cytoplasma uppstår. Samtidigt har det på platsen för den ursprungliga cellkroppen skett en uppluckring av strukturen, tätheten minskar undan för undan och långsamt blir en rundad, oval eller njurformad kärna med luckert kromatin synlig.

Vid fortsatt observation kan man iaktta uppkomsten av vacuoler och även veckbildningar, vilka går genom cytoplasman som en vågrörelse. Cellens form förändras nästan oupphörligen på grund av att cytoplasman dras in på ett ställe av cellen, skjuter ut på ett annat ställe, samtidigt som nya vacuoler bildas i cytoplasman.

Denna celltyp skiljer sig markant från övriga celler i CSV genom sin storlek och sitt utseende. Den kallas i det följande för makrofag.

De neutrofila leukocyterna är runda innan de fäst på objektglaset. Jämfört med lymfocyterna karakteriseras de av en högre optisk täthet och av en svag men tydlig gulfärgning. En del neutrofila leukocyter bibehåller detta utseende, när de fäst på glaset. Andra förändras. Somliga plattas ut en smula,

blir päronformade, samtidigt som den gula tonen försvinner utom just perifert i cellen. Ibland avstannar transformationsprocessen på detta stadium, men stundom fortskrider den så att celler till slut helt ändrat utseende. Den är till ytan ungefär dubbelt så stor som den ursprungliga, runda cellen. Cytoplasman är oregelbunden i konturerna, och det är svårt att identifiera några detaljer i cellen. Genom att göra små snabba ändringar av fokuseringen kan en segmenterad kärna skönjas. Cellen ser spräcklig ut, sällan kan distinkta granula identifieras i cytoplasman.

Eosinofila leukocyter är runda, lyser intensivt gult och innehåller tydliga, tätt packade svarta granula. En del eosinofila leukocyter fäster på objektglaset, varvid de förändras och antager ett utseende påminnande om den transformerade neutrofila leukocyten. Den eosinofila leukocyten cytoplasma innehåller glesa, tydliga granula till skillnad från den neutrofila leukocyten.

Celler som fagocyterat erythrocyter (erythrofager) hemosiderin och/eller hämatoidin (siderofager) är lätta att identifiera. Hemosiderinet förekommer som oregelbundna, gulbruna klumpar och hämatoidinet som vackert lysande, gulbruna, romboida kristaller.

Celler i plasmacellserien och basofila leukocyter, vilka senare är sällsynta i CSV, har författaren ej kunnat identifiera i faskontrast. Vid differentialräkningen i faskontrastmikroskop klassificerades de förstnämnda sannolikt som monocytära celler. Identifiering av dessa celler sker efter färgning ad modum May-Grünwald-Giemsa.

Som atypiska celler klassificeras de som avviker i utseende

från de ovan beskrivna. För att om möjligt identifiera dem
erfordras undersökning i ljusmikroskop efter färgning.

Ljuskioskopi. Efter fixering och färgning är cellernas
morfologi i regel väl bevarad. Fläckvis kan ibland lufttork-
ningen gå långsamt och därvid erhålles dåligt färgnings-
resultat med tendens till överfärgning.

Makrofagerna har samma utseende i de färgade preparaten som
i faskontrastmikroskop. Cytoplasman färgas mycket svagt, men
är tydligt skönjbar med vacuoler, granula och pseudopodier av
olika utseende. Kärnan färgas betydligt starkare, har ett
luckert kromatin och en distinkt kärnmembran.

De monocytära cellerna varierar starkt i utseende. Kärnan kan
vara vindlande, hästskoformad, njurformad, rundad, halvmån-
formad, klöverbladsformad eller pseudosegmenterad. Kärn-
strukturen kan vara lucker, som hos makrofagerna, eller tät,
som hos lymfocyterna. Förhållandet mellan kärna och cyto-
plasma varierar: kärnan kan fylla nästan hela cellen eller
vara tunn och excentriskt belägen så att cellen liknar en
signet-ring-cell.

Fagocyterat hämosiderin förekommer som blåsvarta granula
eller klumpar, medan hämatoidinet har samma utseende som i
faskontrast, dvs gulbruna, romboida kristaller.

Lymfocyter, granulocyter och celler i plasmacellserien ter
sig på samma sätt som i hämatologiska preparat färgade ad
modum May-Grünwald-Giemsa.

Fagocytosförmåga hos cerebrospinalvätskans mononukleära celler (II)

Endast makrofager och monocytära celler fagocyterade tillfört tusch. Lymfocyter innehöll aldrig några fagocyterade granula.

Fagocytosgraden visade betydande variationer vid olika tillstånd. I de CSV-prover, där makrofagantalet var litet och transformationsgraden låg, som exempelvis i CSV från neurologiskt friska personer och från patienter med multipel skleros, var fagocytosen minst uttalad. Här förekom små, distinkta, glest belägna granula i endast 10-30% av de monocytära cellerna och makrofagerna. I CSV, som karakteriserades av livlig transformation med kraftigt inslag av makrofager, hade flertalet, ibland samtliga monocytära celler och makrofager, fagocyterat. Granula var här betydligt större och förekom i ett större antal. I en del celler sågs sammanhängande konglomerat av tusch.

Den mest uttalade fagocytosen iaktogs i fall av subarachnoidalblödning och cerebral hemorragisk infarkt. Hos dessa patienter kunde också en mycket livlig transformation av cellerna konstateras med kraftig makrofagreaktion. Maximal fagocytosgrad iaktogs några dygn efter insjuknandet. Vid subarachnoidalblödningarna sammanföll detta i tiden med uppträdandet av erythrofager.

Utvinningsgrad, validitet och reliabilitet vid anrikning i sedimentkammare (I)

Efter en timmes sedimentering utvanns före fixering och

färgning genomsnittligen 60% av det totala antalet celler. Vid praktiskt taget varje sedimentering kan en utvinningsgrad av minst 50% förväntas.

Vid fixering och färgning av sedimentet förlorades många celler, vilket resulterade i en låg utvinning, ca 20%.

För att studera metodens validitet utfördes fyra simultana sedimenteringar på varje CSV-prov från 19 patienter. På varje sediment utfördes differentialräkning i faskontrastmikroskop. Spridningen av frekvenstalen för de olika celltyperna föll inom gränsen för slumpmässig variation.

Reliabiliteten undersöktes genom en jämförelse av fördelningen av makrofager, monocytära celler och lymfocyter före och efter sedimentering av CSV från 37 patienter. Skillnaderna i frekvenstal visade sig ej vara större än att de kunde tillskrivas slumpmässiga variationer.

Diskussion

Sayk (4) har för monocytära celler, som sedimenterat, fixerats och färgats på glas, infört en nomenklatur och klassificering, som nu är allmänt accepterad. På morfologiska grunder indelar han cellerna i många olika typer och subtyper men antar att de utvecklas från en gemensam leptomeningeal stamcell. Eftersom de monocytära cellerna har en betydande tendens att undergå transformation när de fäster på glas får de då ett mycket varierande utseende. Det förefaller därför inte meningsfullt att infoga de monocytära cellerna i ett statistiskt system. Kontakten med glas är emellertid inte den enda förutsättningen för att en transformation av den monocytära cellen skall ske. I så fall skulle samtliga monocytära celler omvandlas. De celler, som transformeras måste på något sätt ha stimulerats "in vivo". En del monocytära celler i CSV förefaller således vara förutbestämda att vid kontakt med glas utvecklas till typiska makrofager.

Med Sayks sedimentkammarmetod erhålles en cytomorfologi, som skiljer sig något från den, som författarens metod ger, sannolikt beroende på skillnader i fixeringsförfarandet. I slutfasen av sedimenteringen i Sayks kammare sker en spontan lufttorkning av den tunna vätskehinna, som blir kvar. Under intorkningen förändrar cellerna utseende. En avrundning av konturerna äger rum i såväl kärna som cytoplasm. Detta medför bl a, att den celltyp, som i föreliggande arbete benämnes makrofag, ej kan identifieras. En del lymfocyter förändras också och antager ett utseende påminnande om plasmaceller, vilket medför risk för överdiagnostik av så kallade plasmocytära celler.

Efter en timmes spontan sedimentering är det sällsynt att vid

faskontrastundersökningen finna tecken på degeneration av cellerna eller döda celler. Sayk finner, att ca 14% av cellerna i hans färgade sediment uppvisar betydande åldersförändringar. I vissa fall har han funnit drygt 50% "cellskuggor". Sannolikt beror förekomsten av cellskuggor på den långsamma lufttorkningen av preparatet, då många celler går under.

Sayk (4) uppger, att hans anrikningsmetod ger en utvinning av 50%-60%, medan Bammer (5) med en metod modifierad efter Sayk, utvinner 20%-30%. Ingen av författarna beskriver emellertid hur utvinningsgraden beräknats. Med såväl Sayks metod som författarens sker ett stort svinn av lymfocyter vid framställning av färgade sediment, då dessa celler fäster mycket dåligt på glas. I Sayks kammare sugs de ut i omgivande filterpapper och med författarens metod sugs de upp i filterpapperet. Härigenom åstadkommes en betydande överrepresentation av celler, som fäst på glas, exempelvis monocytära celler, makrofager och granulocyter. Detta medför, att den differentialräkning som utföres på ett färgat sediment ej blir representativ för cellfördelningen i CSV, vilket däremot den differentialräkning blir, som sker i faskontrastmikroskop.

Författarens metod kan användas även för screening av cancer-celler. Vid faskontrastmikroskopi skiljer sig dessa starkt från övriga cellformer i CSV. Andra former av maligna celler, såsom exempelvis leukemiceller, kan svårligen skiljas från lymfocyter och monocytära celler. Då erfordras studium av May-Grünwald-Giemsa färgade preparat.

Eftersom den differentialräkning, som utföres i faskontrastmikroskop motsvarar den reella cellfördelningen i CSV även om anrikning av celler genom sedimentering varit nödvändig, kan

med denna metod det cytologiska skeendet i CSV vid olika neurologiska sjukdomstillstånd följas på ett säkrare sätt än som tidigare varit möjligt.

Cerebrospinalvätskans cytologi under normala förhållanden hos vuxna (III)

Materialet utgjordes av 38 personer i åldern 16-62 år. CSV innehållande mer än 100 röda blodkroppar per 10 mm^3 och/eller med en totaläggvita överstigande 45 mg% medtogs ej.

En patient hade 6,2 mononukleära celler per mm^3 , en hade 4,4 celler och övriga hade celltal, som varierade mellan 0,3 och 2,8 celler. Ett medelvärde erhöles på 1,45 mononukleära celler per mm^3 .

	Medianvärde	Spridning
	%	%
Makrofager	2,0	9 - 0
Monocyter	10,5	28 - 0
Lymfocyter	86,5	99 - 63

Granulocyter förekom ej hos någon patient

Vid undersökning i faskontrastmikroskop kunde ibland förtätningar ses i makrofagernas cytoplasma och även uppkomsten av cytoplasmautskott, men i regel förhöll sig makrofagerna passiva. En del av dem innehöll perinukleära granula och små vacuoler.

I de färgade preparaten hade den rundade välavgränsade monocytära cellformen en oval, rund eller njurformad kärna. Den

"kantiga" typen företedde en rikligare formvariation av kärnan. Cytoplasman var sprödare och svagare färgad jämfört med den "runda" typen.

Cerebrospinalvätskans cytologi under normala förhållanden hos spädbarn

Materialet utgjordes av 13 spädbarn. Nio undersöktes under den första levnadsveckan, en under tredje, en under fjärde och två under den femte veckan. För alla gällde att graviditet och förlossning förlöpt komplikationsfritt. Patienterna överfördes från förlossningsavdelningen till barnkliniken på grund av symtom, som fordrade en utredning. Som ett led i den allmänna utredningen ingick lumbalpunktion. De patienter, som medtogs i studien, hade transitoriska symtom, som senare visade sig ej ha neurologisk orsak. Bortsett från de transitoriska symtomen var neonatalperioden komplikationsfri och vid efterundersökningar, som utfördes från 11 månader till $2\frac{1}{2}$ år efter förlossningen var barnen normalt utvecklade.

Frekvensen av olika celltyper framgår av nedanstående tabell.

	Median	Spridning
Mononukl. celler	$7,8/\text{mm}^3$	1,7 - 11,0
Erythrocyter	$180/\text{mm}^3$	0,8 - 3000
Makrofager	0%	0% - 9%
Monocytdära celler	63%	32% - 85%
Lymfocyter	46%	15% - 66%

Hos sju patienter förekom neutrofila leukocyter såväl vid räkningen av totala antalet celler som vid differentialräkningen. De kunde dock förklaras av tillblandningen av peri-

fert blod utom i ett fall, som hade sju erythrocyter/mm³ och 0,1 polynukleära celler/mm³ samt 1% neutrofila leukocyter vid differentialräkningen.

I de ad modum May-Grünwald-Giemsa färgade preparaten förekom en markant dominans av monocytära celler. Karakteristiskt var en uttalad variation av cytomorfologien. De monocytära cellerna var huvudsakligen av den "runda" typen. Det förekom en mängd olika kärnformer från runda till kraftigt vindlande och pseudosegmenterade. Cellstorleken varierade betydligt, liksom även cytoplasmans utseende och färgbarhet. Celler med kraftigt vakuoliserad cytoplasma eller av signetcellsutseende var ej ovanliga. Varken vid undersökning i faskontrast- eller ljusmikroskop iaktogs erythrofager eller siderofager.

Cerebrospinalvätskans cytologi vid multipel skleros (IV)

Under en tvåårsperiod undersöktes CSV från 69 MS-patienter med den beskrivna metoden. Den cytologiska undersökningen omfattade bestämning av totala antalet celler och differentialräkning i faskontrastmikroskop samt färgning av sediment ad modum May-Grünwald-Giemsa.

Frekvensen av förekommande celltyper ges i nedanstående tabell

	Median	Spridning
Mononukl. celler	4,9 mm ³	0,5 - 54
Makrofager	1%	0 - 22
Monocytära celler	10%	2 - 34
Lymfocyter	89%	58 - 99

Polynukleära celler förekom ej i något fall.

Vid undersökning av de färgade sedimenten fanns basofila mononukleära celler hos 46% av patienterna. I samtliga fall förekom de i lägre frekvens än 1%. De basofila cellerna uppträdde i principiellt två olika typer. Den vanligaste typen utgjordes av 10-20 μ m stora celler, runda eller ovala med basofil cytoplasma. Kärnan upptog i regel hälften eller mer av cellen och perinukleärt sågs en uppklarning i cytoplasma. Endast i undantagsfall förekom celler, som bedömdes som mogna plasmaceller. Den andra, mindre ofta förekommande typen varierade även den mellan 10-20 μ m i storlek. Kärnan upptog nästan hela cellen och omgavs av en smal cytoplasma, som var så intensivt basofil, att det var svårt att skilja den från kärnan.

Patienterna indelades i två grupper. Den ena gruppen (MS_1) bestod av 21 patienter, som undersökts mindre än en månad och den andra (MS_2) av 48 patienter, som undersökts mer än en månad efter den senaste exacerbationen av sjukdomen.

I MS_1 -gruppen var medianvärdet för antalet celler per mm^3 5,8 och i MS_2 -gruppen 4,2. Skillnaderna mellan grupperna var ej statistiskt signifikant vad beträffar celltalen och ej heller med avseende på den relativa fördelningen av makrofager, monocytära celler eller lymfocyter ($p > 0,10$).

Celltal överstigande 5 per mm^3 förelåg i 62% av fallen i MS_1 -gruppen och i 42% i MS_2 -gruppen. Basofila mononukleära celler registrerades i 67% av fallen i MS_1 -gruppen och i 38% i MS_2 -gruppen. Båda dessa skillnader var statistiskt signifikanta ($p < 0,01$).

De basofila mononukleära cellerna syntetiserade DNA med undantag för de få mogna plasmaceller, som kunde identifieras.

Vid autoradiografiundersökningen iakttogs en kraftig granulär svärtning av filmen nästan enbart över kärnorna. Bakgrundsaktiviteten var negligerbar.

Vid de elektronmikroskopiska undersökningarna av celler i CSV från en MS-patient dominerade lymfocyter kraftigt i snitten. Endast en mogen plasmacell med högt utvecklat lamellärt endoplasmatiskt retikel identifierades. Dessutom sågs enstaka mononukleära celler med excentriskt belägen kärna innehållande en eller flera nukleoler och med ett grovt endoplasmatiskt retikel mestadels lågt utvecklat men stundom med tendens till lamellärt arrangemang.

I syfte att jämföra de cytologiska fynden vid MS med cellbilden i CSV vid andra neurologiska sjukdomar valdes 169 patienter från samma tidsperiod som MS-patienterna. De utgjordes av patienter med bakteriell meningit, polyneuropati, intrakraniell tumör, medullär kompression, cerebral infarkt samt subarachnoidalblödning i resorptionsstadium.

I meningitgruppen förekom basofila mononukleära celler i 54% av fallen. Endast en patient (2%) med subarachnoidalblödning hade basofila mononukleära celler och fem patienter (16%) med cerebral infarkt. Hos patienterna i de övriga kontrollgrupperna uppträdde ej denna cellform.

Vid en statistisk analys av materialet med hänsyn till förekomsten av makrofager, "runda" och "kantiga" monocytära celler samt lymfocyter konstaterades, att lymfocyter och "runda" monocytära celler dominerade över makrofager och "kantiga" monocytära celler i MS-grupperna och meningitgruppen. I övriga grupper rådde motsatt förhållande. Skillnaderna var statistiskt signifikanta ($p < 0,01$).

Cerebrospinalvätskans cytologi vid cerebrala infarkter och lobära hämatom (V)

Vid infarcering av cerebral vävnad sker initialt enligt Adams och Sidman (6) en invandring av polymorfkärniga neutrofila leukocyter (PNL) med maximum efter ungefär 48 timmar, varefter de minskar i antal och degenererar. Mononukleära celler är talrika från femte dagen till omkring en månad efter insulten. Detta cellulära förlopp återfinnes i såväl hämorrhagiska som bleka infarkter, men PNL-reaktionen är kraftigare i det förra fallet. Enligt Feigin (7) är antalet PNL större ju kraftigare det hämorrhagiska inslaget är i infarkten.

Huruvida en infarkt skall bli hämorrhagisk eller ej beror på vilka möjligheter som föreligger att återställa blodflöde. Detta kan ske antingen direkt via den tillförande artären, som är vanligt vid embolisering, eller indirekt via kollateralkretslopp.

Även vävnad, som omger intracerebrala hämatom infiltreras under de första dygnen av PNL och 2-4 dygn efter inträffad blödning är PNL-reaktionen uttalad för att sedan klinga av (8).

Cytologisk undersökning av CSV utfördes på nästan alla patienter, som under åren 1965-1968 intogs på neurologiska kliniken på grund av färsk cerebrovaskulär insult. Vanligen gjordes lumbalpunktion vid intagningen och om möjligt upprepades punktionen med 2-3 dagars intervall under den första veckan och därefter en gång i veckan.

Endast patienter som lumbalpunkterades inom tre dygn efter insjuknandet tilläts ingå i materialet. Patienter med makroskopiskt blodig CSV uteslöts från undersökningen. Följande fem grupper utvaldes för den aktuella studien:

Grupp 1 (26 fall)

Infarkter i arteria carotis internas utbredningsområde utan röntgenologiskt påvisbart kollateralkretslopp.

Grupp 2 (25 fall)

Infarkter i arteria carotis internas utbredningsområde med röntgenologiskt påvisbart kollateralkretslopp.

Grupp 3 (41 fall)

Cerebrala infarkter till följd av embolier utgångna från hjärtat.

Grupp 4 (16 fall)

Intracerebrala lobära hämatom utan genombrott till ventrikelsystemet.

Grupp 5 (18 fall)

Cerebrala infarkter, verifierade vid obduktion.

För att studera frekvensen och graden av s k stickblödning undersöktes 50 slumpmässigt utvalda patienter med myelopathi eller polyneuropathi. Antalet erythrocyter i CSV visade ett medianvärde på 12 per 10 mm^3 med en spridning från 0-7500. (Fig. 1, sid 27.)

I CSV, som innehöll röda blodkroppar reducerades antalet PNL enligt formeln $\frac{PNL_b}{R_b} R_{CSV} = q$.

Procenttalet PNL i differentialräkningen reducerades enligt formeln $\frac{100 q}{V_{CSV}}$

PNL_b = antalet PNL/mm³ i perifert blod

R_b = antalet röda blkr/mm³ i perifert blod

R_{CSV} = antalet röda blkr/10 mm³ i CSV

V_{CSV} = antalet vita blkr/10 mm³ i CSV

Upprepade lumbalpunktioner utfördes på 10 patienter med multipel skleros, vilka alla hade mindre än 5 mononukleära celler per mm³ och som befann sig i ett kliniskt stationärt skede av sjukdomen. Det konstaterades att lumbalpunktionerna ej medförde någon förändring av totala antalet celler i CSV eller på fördelningen av de olika celltyperna.

Maximalvärden för totala antalet celler. I grupp 1 erhöles ett normalt antal celler i 90% av fallen, i grupperna 2 och 3 i 70% och i grupp 4 endast i 20% av fallen. I grupp 1 var medianen 1,2 celler per mm³, i grupperna 2 och 3 ca 3 celler och i grupp 4, hämatomgruppen, var medianvärdet högt, 70 celler per mm³. Det största antalet celler (21000) förekom hos en patient i hämatomgruppen.

Median- och spridningsvärden för de mononukleära och polynukleära cellernas och de röda blodkropparnas maximala antal under sjukdomsförloppet samt för de röda blodkropparna i kontrollgruppen (Fig. 1) I normalmaterialet var medianen för antalet makrofager 0,3 per 10 mm³ och för monocytära celler 1,3. PNL förekom ej normalt i CSV.

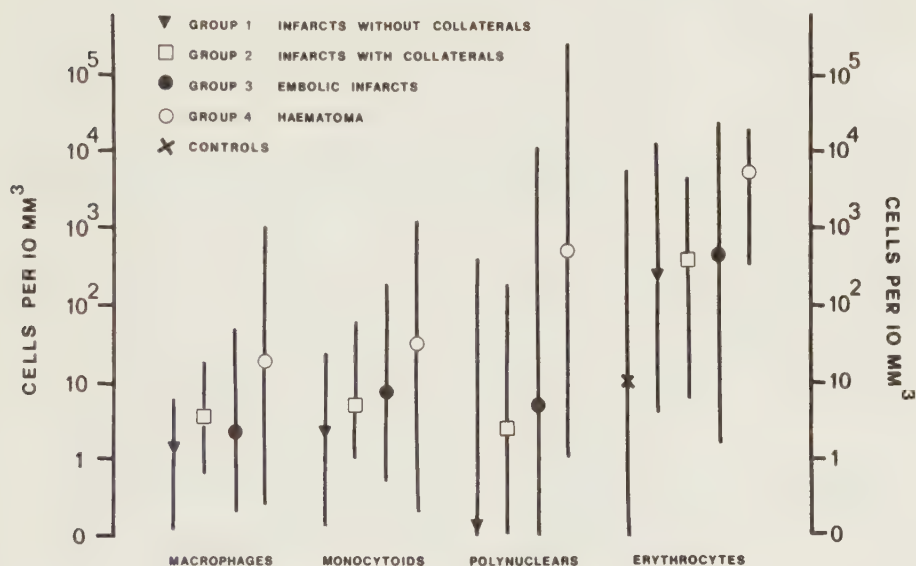


Fig. 1

Median- och spridningsvärden för de mononukleära och polynukleära cellernas och de röda blodkropparnas maximala antal under sjukdomsförloppet samt för de röda blodkropparna i kontrollgruppen. Antalet celler är angivna efter en semi-logaritmisk skala.

I grupp 1 registrerades hos de flesta patienterna inga eller få PNL. Medianen var mycket låg. Endast två patienter hade ett måttligt förhöjt antal PNL. Patienterna i grupp 4, hämatomgruppen, reagerade däremot mestadels med en kraftig PNL-

reaktion, vilket resulterade i ett högt medianvärde. I grupperna 2 och 3 hade de flesta patienterna en tydlig PNL-reaktion i CSV om ock svagare än i grupp 4.

Medianvärdena för makrofager och monocytära celler var i grupp 1 endast lätt förhöjda. I grupperna 2 och 3 var medianerna för motsvarande celler måttligt förhöjda och i grupp 4 uppnåddes höga medianvärden.

I grupp 1 erhöles för antalet röda blodkroppar ett medianvärde, som låg obetydligt lägre än i grupperna 2 och 3, i vilket medianvärdena var av ungefär samma storleksordning. Som väntat var medianen högst i grupp 4. I kontrollgruppen var medianen låg men spridningen stor. Eftersom många patienter i de kroniska grupperna var oroliga och medverkade dåligt vid lumbalpunktionen är det troligt, att en hög frekvens av stickblödning påverkat antalet röda blodkroppar i dessa grupper.

Spridningen av de olika celltypernas frekvenstal sammanföll till en viss del, vilket gjorde det omöjligt att dra entydiga slutsatser angående grupptillhörighet med utgångspunkt från värdena i ett enstaka fall.

Temporal profil för makrofager, monocytära celler och PNL
(Fig. 2). Medianvärdena för de olika celltyperna per 10 mm^3 bestämdes för varje dag under den första sjukdomsveckan och sedan veckovis.

I grupp 1 var medianerna för PNL 0 under hela observations-tiden. I grupperna 2 och 3 hade tre patienter av 13 mindre än 1 PNL den första dagen; övriga hade inga PNL. De tre patienter i grupp 4, som undersöktes på insjukningsdagen, hade däremot 1,5, 6 resp 13 PNL. I grupperna 2 och 3 nåddes ett maximalt

medianvärde på fjärde dagen, ca 4 PNL, och i grupp 4 på tredje dagen, 1350 PNL. Ungefär en vecka efter insjuknandet hade medianvärdena sjunkit till 0 i grupperna 2, 3 och 4.

I grupp 1 var medianerna för antalet makrofager och monocytära celler lätt förhöjda under observationstiden. I grupperna 2 och 3 nådde dessa cellers medianvärden sina maxima mot slutet av första veckan, i grupp 4 redan på den tredje dagen. Vid slutet av observationstiden var medianvärdena fortfarande lätt - måttligt förhöjda i alla grupper.

Statistisk analys av skillnader mellan grupper. Diskriminantfunktionerna för grupperna 2 och 3 var ej signifikant skilda från varandra ($p > 0,05$), varför de bägge grupperna betraktades som en grupp vid reklassifikationen. PNL syntes vara den celltyp som hade den största betydelsen för bestämning av grupptillhörighet. Vid reklassifikationen hänfördes de flesta patienterna till sina ursprungliga kliniska grupper. Ingen patient från grupp 1 hänfördes till grupp 4 eller vice versa. En viss "overlapping" uppstod mellan de sammanslagna grupperna 2 + 3 och de två övriga grupperna.

Erythrofagocytos och siderofagocytos. Vid undersökning av cellerna i faskontrast och i de färgade preparaten hade ingen patient i grupp 1 erythrofagocyter eller siderofagocyter, vilket däremot registrerades hos 17% av patienterna i grupp 2, hos 21% i grupp 3 och hos 38% i grupp 4.

Oxyhämoglobin-absorption. Medianen för de maximala absorptionsvärden, som uppmättes under sjukdomsförloppet, låg i grupp 1 under övre normalgränsen (0,019). I grupperna 2 och 3 var medianerna lätt förhöjda (0,022, 0,027) och i grupp 4 var medianen, som väntat, hög (0,058). Någon signifikant sam-

FIG 2 A

GROUP 1



FIG 2 B

GROUP 2

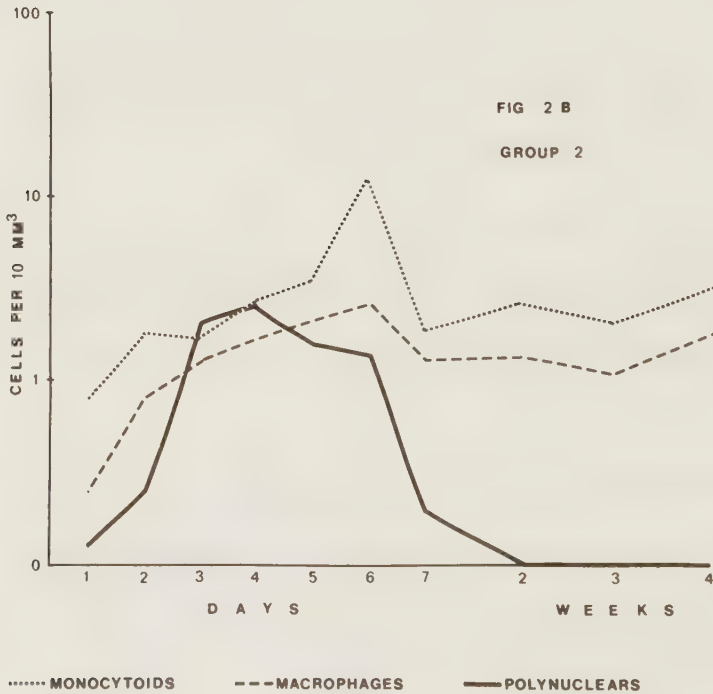


FIG 2 C

GROUP 3

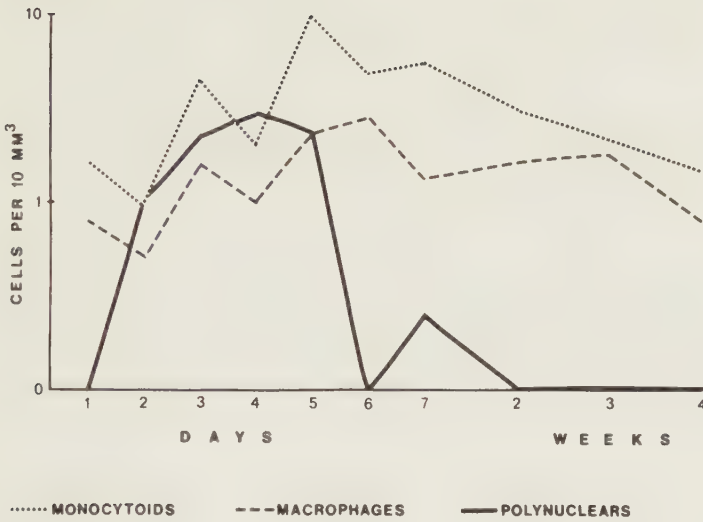
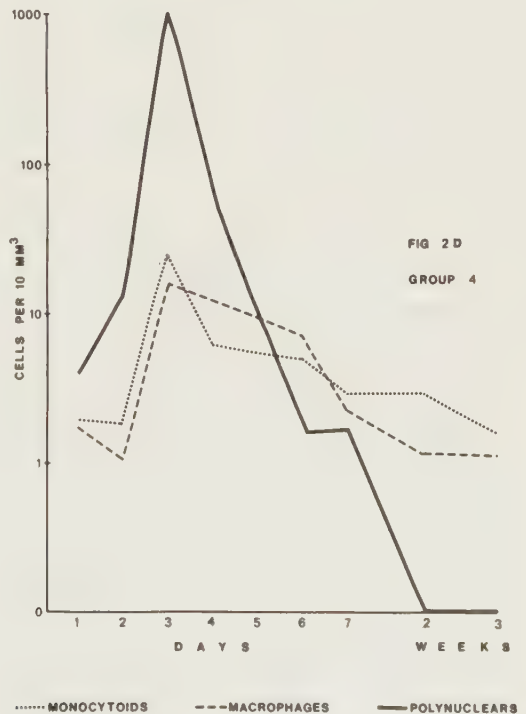


Fig. 2

Medianvärden för makrofager, monocyttära celler och PNL beräknade för varje dag under första sjukdomsveckan och sedan veckovis. Antalet celler är angivna efter en semi-logaritmisk skala.



variation mellan antalet röda blodkroppar och oxyhämoglobinabsorptionsvärden eller mellan antalet PNL och röda blodkroppar förelåg ej, sannolikt beroende på förekomst av stickblödning.

Endast i grupp 4 påvisades en signifikant samvariation mellan antalet PNL och oxyhämoglobinabsorptionsvärden.

I grupperna 1, 2 och 3 fanns sammanlagt 21 patienter, som företedde en PNL-reaktion i CSV utan att oxyhämoglobinabsorptionsvärdet var förhöjt. Hos fem patienter var förhållandet motsatt.

Grupp 5. Sju patienter avled inom 6 dagar efter insjuknandet. Fyra av dessa hade makroskopiskt bleka infarkter och tre hade hämorrhagiska infarkter. Samtliga hade en PNL-reaktion i den infarcerade hjärnvävnaden. De kraftigaste reaktionerna sågs hos två patienter med 3 dagar gamla hämorrhagiska infarkter. Deras CSV innehöll också det största antalet PNL.

Det lägsta antalet PNL i CSV fanns hos fyra patienter, som hade makroskopiskt bleka infarkter. Tre av dem hade endast en obetydlig infiltration av PNL i den infarcerade hjärnvävnaden.

11 patienter avled senare än en vecka efter insjuknandet. Hos dem som ej hade några siderofager eller endast få sådana i infarcerad vävnad, förekom inga eller ett litet antal PNL i CSV under den första sjukdomsveckan. En patient med måttlig och två med kraftig infiltration av siderofagocyter hade påtaglig PNL-reaktion i CSV.

Cerebrospinalvätskans cytologi vid intrakraniella blödningar i nyföddhetsperioden

Materialet omfattar 62 patienter. De företedde under neonatalperioden symptom tydande på cerebral påverkan eller hade genomgått en abnorm förlossning.

32 patienter visade ej tecken på blödning i CSV, dvs erythrofager eller siderofager påvisades ej, vilket däremot var fallet hos de övriga 30 patienterna. Samtliga patienter undergick upprepade kontroller omfattande bedömning av den psykomotoriska utvecklingen enligt ett modifierat Gesellschema samt neurologiskt status. Efterundersökningarna utfördes från 14 månader till 3 år efter förlossningen.

Av de 32 barn, som ej företedde cytologiska tecken på blödning i CSV, utvecklades 28 (88%) normalt. Av de 30 barnen med cytologiskt diagnostiserad blödning utvecklades endast 12 normalt, medan 18 (60%) senare företedde symptom på cerebral skada i form av abnorm utveckling, beteendestörning, kramper eller cerebral pares.

En patient ur blödningsgruppen är av särskilt intresse. Hon föddes efter en normal graviditet och efter 2 dygns värkarbete. Födelsevikten var 3770 g. Tecken på asfyxi förelåg ej men huvudomfånget var vid övre gränsen för det normala. På fjärde levnadsdagen var det uppenbart att en hydrocefalus var under utveckling och lumbalpunktion utfördes. CSV innehöll 20 mononukleära celler och 33 erythrocyter/mm³. 65% av cellerna var kraftigt inlagrade med hämosiderin. Därav kunde fastställas, att patienten haft en intrakraniell blödning, som var betydligt äldre än 4 dagar, dvs hade inträffat prenatalt. Patienten shuntopererades vid 3 månaders ålder. Vid 2½ års ålder var hon gravt retarderad och uppvisade ett uttalat CP-syndrom.

Diskussion

Jessen (9) undersökte i ljusmikroskop CSV-celler utan föregående fixering eller färgning. Han fann, att det normalt förekom lymfocyter och monocytära celler. De sistnämnda uppträdde i två former: en rund form, påminnande om blodmonocyten, och en oregelbunden "polygonal" form. De "polygonala" cellerna varierade i storlek och utseende. En del företedde ett eller flera cytoplasmautskott. Någon frekvensfördelning gavs ej, men Jessen fann att lymfocyter dominerade. Även i föreliggande arbete kunde konstateras, att cellerna i det undersökta normalmaterialet huvudsakligen utgjordes av lymfocyter och att de monocytära cellerna varierade från runda till "kantiga" former av olika storlek och utseende. Att Jessen ej iakttog makrofager berodde på att dessa ej kan identifieras i genomfallande ljus.

Även enligt Sayk (4) förekommer det normalt i CSV lymfocyter och monocytära celler. Som normalvärden anger han för lymfocyter 70%-100% och för monocyter 0%-30%. Kolar och Zeman (10), som använder sig av en sedimentkammarmetod modifierad efter Sayk, uppger att det normalt i CSV förekommer 60%-70% lymfocyter, ibland t o m 100%.

Jessen räknade antalet celler i minst 100 mm^3 av varje CSV-prov från sina normalfall. Han fann ett medelvärde på 1,36 celler per mm^3 och satte en övre gräns på 5 celler per mm^3 . I föreliggande undersökning erhöles ett medelvärde på 1,45 celler per mm^3 och alla utom en patient hade mindre än 5 celler per mm^3 , ett resultat som således nära sammanfaller med Jessens.

Jessen konstaterade, att polynukleära celler var utomordent-

ligt celltyoga i dess material. Sayk anser, att polynukleära celler ej förekommer normalt i CSV. Kolar och Zeman nämner att förekomst av en enda polynukleär cell tyder på en patologisk process i centralt nervsystemet. I föreliggande arbete förekom ej celler någon granulocyt varken vid undersökning i rakarekammaren eller vid differentialräkningen efter sedimentering.

Det ställer sig svårt, att erhålla ett större material av helt friska människor. De patienter, som ingår i föreliggande undersökning har alla haft psykiska eller somatiska symptom, vilka föranlett läkarconsultation. Ingen har dock företett symptom eller kliniska tecken tydande på neurologisk sjukdom. Det kan naturligtvis ej uteslutas att det i materialet detta sammantaget finns någon enskild person, som ej är neurologiskt frisk. Det stora flertalet patienter torde dock kunna betraktas som neurologiskt friska och således lämpade för en cytologisk undersökning av CSV.

Det har tidigare visats att antalet celler i CSV hos neurologiskt friska spädbarn är högre än hos neurologiskt friska vuxna. Widell (11) undersökte 30 friska spädbarn under de två första levnadsveckorna och fann genomsnittligen 7,5 vita blodkroppar per mm^3 med en spridning från 0-15 celler. Motsvarande värden i föreliggande arbete var 7,8 resp 1,7 - 11,0. I ett viktigt avseende skiljer sig resultatet från Widells. Han uppger att polynukleära celler dominerade cellbilden och genomsnittligen utgjorde 50% av totala antalet vita blodkroppar. Endast i ett fall av 13 fanns i föreliggande material neurofila leukocyter (0,1 per mm^3), som ej kunde förklaras av perifer blodtillblandning. Diskrepansen torde bero på att de granulocytära cellerna i CSV från spädbarn ofta har en påfallande pleomorf kärna, som vid färgning ad

modum Fuchs-Rosenthal (1) eller liknande metod, felaktigt identifieras som polynukleära. Över huvud taget kan det vara svårt att med de metoder för cellräkning, vilka utnyttjar olika typer av kärnfärgning, skilja mellan mononukleära och polynukleära vita blodkroppar på grund av den pleomorfism, som ofta kännetecknar de monocytära CSV-cellerna.

Förekomsten av olika typer av plasmaceller anses vara karakteristiskt för cellbilden i CSV vid MS. Enligt Sayk (4) och Bishoff (12) förekommer dock sällan den klassiska plasmacellen, vilket också stämmer med författarens erfarenhet. De former, som finns i MS-CSV, uppfattas som förstadier till plasmaceller och benämnes vanligen plasmocytära celler.

I Sayks material (220 patienter) fanns plasmocytära celler i 61% av fallen (4), i Bishoffs (111 patienter) i 63% (12), i Gregers och Wiezoreks (404 patienter) i 67% (13) och i föreliggande arbete (69 patienter) i 48% av fallen. De högre frekvenssiffrorna kan förklaras av att de ovan nämnda författarna huvudsakligen undersökt patienter med exacerbation av sjukdomen. I föreliggande undersökning hade 70% av patienterna i MS₁-gruppen celler i plasmacellserien. I denna grupp torde flertalet patienter ha befunnit sig i ett akut skov.

Hos de patienter som hade plasmocytära celler i CSV varierade den relativa frekvensen av dessa celler i Sayks material från 10% till 38%, i Bishoffs material från 1% till 39% och i Gregers och Wiezoreks från 2% till 20%. I det egna materialet förekom plasmocytära celler alltid i lägre frekvens än 1%. Diskrepansen kan bero på överdiagnostik av plasmocytära celler vid användande av Sayks sedimentkammarmetod (se sid 17).

I författarens material fanns plasmaceller och plasmocytära celler hos många patienter med MS och abakteriell meningit men endast hos en patient med subarachnoidalblödning i resorptionsstadium och hos några få med cerebral infarkt. Den cytologiska bilden företedde påfallande likheter vid MS och abakteriell meningit men skilde sig genom den uttalade pleocytosen vid abakteriell meningit. Det är således möjligt att använda den cytologiska undersökningen av CSV i diagnostiskt syfte vid klinisk misstanke på MS.

Basofila mononukleära celler har påvisats i perifert blod hos patienter med virusinfektioner (14, 15), vissa "autoimmuna" sjukdomar (16), akut disseminerad encefalomyelit, polyneuropati vid maligna tumörer och Guillain-Barré syndrom (17) samt vid akut hämorrhagisk leukoencefalit (18). Samma typ av celler har påträffats i blod hos djur, som åsamkats experimentell allergisk encefalit (EAE) (19) och experimentell allergisk neurit (EAN) (20). Dessa celler är kraftigt DNA-syntetiserande (18) och elektronmikroskopiskt karakteriseras de av ett mer eller mindre väl utvecklat endoplasmatiskt retikulum (21, 22). Det har också visats att de kan producera antikroppar (23). Det synes rimligt anta, att de basofila, DNA-syntetiserande mononukleära cellerna i CSV vid MS är identiska med de celler, som vid den elektronmikroskopiska undersökningen tedde sig som plasmacellsprekursorer. De basofila mononukleära cellerna i CSV vid MS torde således på dessa grunder kunna betraktas som cirkulerande immunocyter, vilket stöder antagandet om att immunologiska processer är inblandade vid sjukdomsprocessen.

Intressant i detta sammanhang är att dylika celler ej kunnat påvisas i perifert blod hos patienter med MS (17). Två hypoteser, som skulle kunna förklara detta förhållande, ligger

nära till hands. Antingen sker hela utvecklingen från plasma-cellprekursor till mogen plasmacell intrathekalt eller har de cirkulerande immunocyterna effektivt absorberats från blodet till centrala nervsystemet när sjukdomen manifesterat sig kliniskt. En jämförelse kan göras med EAE (19) och EAN (20) där basofila mononukleära celler finns i perifera blodet dagarna efter sensibiliseringen men har försvunnit, när de kliniska symtomen debuterar.

Tidigare har beskrivits enstaka fall av hämorrhagiska infarkter och lobära hämatom (24 - 31), som förlöpt med en neutrofil cellreaktion i CSV. I nästan samtliga fall har det rört sig om höga celltal. Av föreliggande studie framgår, att en transitorisk utsvämning av PNL i CSV kan förekomma vid infarcering och lobära hämatom även när CSV är cellfattig. I själva verket hade 66% av patienterna i de kliniska grupperna normala celltal (< 5 celler per mm^3) och 60% av dessa hade mer än 5% PNL vid differentialräkningen.

Flera skäl talar för att grupp 1 dominerades av patienter med bleka infarkter: röntgenologiskt påvisades ej något kollateralkretslopp; de maximala oxyhämoglobinvärden, som uppmättes under förloppet, låg i de flesta fall under övre normalgränsen; erythrofager och/eller siderofager fanns ej vid något tillfälle i CSV. Följaktligen borde graden av blödning i hjärnparenkymet vara ringa och därmed också PNL-reaktionen i såväl hjärna som CSV. Majoriteten av patienterna i grupp 1 hade mycket riktigt inga eller få PNL i CSV. Endast 2 av 26 patienter visade en måttlig, transitorisk PNL-reaktion.

I grupperna 2 och 3 antogs, att merparten av patienterna hade utvecklat hämorrhagiska infarkter. Antagandet baserades dels

på de teorier, som framförts av bl a Fischer och Adams (32), Feigin (7) och Olivarius (33), dels på fynden av erythrofager och/eller siderofager samt den förhöjda halten av oxyhämoglobin i CSV. De flesta patienterna i dessa bägge grupper hade en transitorisk PNL-reaktion, som mestadels var måttlig men som i tre fall var så kraftig, att diagnosen meningit kunde övervägas (400, 800 resp. 1200 PNL per mm^3).

I grupp 4, hämatomgruppen, erhöles den kraftigaste PNL-reaktionen. Hos samtliga patienter förekom PNL i CSV. Fyra patienter uppvisade mycket höga celltal: 700, 900, 4600 resp 21000 PNL per mm^3 .

I grupp 5, obduktionsgruppen, förelåg en god överensstämmelse mellan PNL-reaktionen i hjärnan och i CSV hos de patienter, som avled under den första veckan. Även här kunde konstateras, att antalet PNL i hjärnparenkymet var större i de hämorrhagiska än i de bleka infarktarna. Undersökningen av de patienter, som avlidit senare än en vecka efter insjuknandet, gav indirekta belägg för att PNL-reaktionen i CSV är kraftigare vid hämorrhagisk än vid blek infarcering.

Den cellreaktion, som äger rum i hjärnparenkymet vid infarcering och blödning, speglas uppenbarligen i CSV såväl vad beträffar mononukleära som polynukleära celler. Undersökning av de vita blodkropparna i CSV torde därför kunna utnyttjas i den kliniska diagnostiken. Av de tre studerade celltyperna, PNL, monocytära celler och makrofager, förefaller PNL vara betydelsefullast när det gäller att differentiera mellan blek infarkt, hämorrhagisk infarkt och lobära hämatom. En påtaglig neutrofil cellreaktion skulle således tala för en hämorrhagisk insult och en uttalad sådan för hämatom. För att fånga den transitoriska PNL-reaktionens maximum bör undersök-

ning företagas på 3:e - 4:e dagen efter insjuknandet, men förekomst av PNL redan första dagen kan indicera ett hämatom, eftersom de förmodade hämorrhagiska infarkterna i det undersökta materialet hade praktiskt inga PNL på insjukningsdagen.

Bestämning av antalet röda blodkroppar och halten av oxyhämoglobin i CSV kan naturligtvis också användas i syfte att diagnostisera en blödning i hjärnparenkymet. I föreliggande arbete visade sig emellertid dessa undersökningar vara dåliga differentieringsinstrument när det gällde att skilja förmodade bleka infarkter från hämorrhagiska. Detta förhållande torde tillskrivas den osäkra faktor, som stickblödning medför.

Det är väl känt, att diagnosen intrakraniell blödning är vanskelig att fastställa hos det nyfödda barnet. Några diagnostiska slutsatser på basen av kliniska symtom kan ej säkert dragas (34). Även fynden i CSV kan vara svåra att värdera. Nyligen har Hellström och Kjellin (35) visat att spektrofotometrisk undersökning av CSV hos nyfödda kan vara av värde för att diagnostisera blödning. Enligt Landell och Sundblad(41) är det ej möjligt att med spektrofotometri skilja en patologisk blödning från en stickblödning i det akuta skedet. Matthews och Frommeyer (36) framhåller, att det s k spikklubbefenomenet ej kan användas för att avgöra huruvida en patologisk blödning föreligger. De konstaterade, att spikklubbebildning ägde rum inom loppet av några sekunder, när CSV blandades med perifert blod. Fenomenet ansågs bero på att CSV är något hypertont i förhållande till plasma.

Påvisandet av erythrofager och siderofager i CSV har använts för att fastställa en intrakraniell blödning hos nyfödda (37, 38, 39). Bishoff och Willi (37) undersökte 43 spädbarn

med avseende på cytologiska blödningstecken i CSV; 23 barn ansågs kliniskt normala, 20 företedde tecken på cerebral påverkan. Författarna konstaterade erythrofagocytos och/eller siderofagocytos hos nästan 50% av barnen i den kliniskt normala gruppen, resp 65% i den patologiska. Någon efterundersökning av barnen gjordes ej. Motsvarande siffror i föreliggande arbete var 0% resp 50%. Skillnaden mellan Bishoffs och föreliggande normalmaterial är anmärkningsvärd och svår att förklara.

Det är möjligt att med cytologisk undersökning av CSV diagnostisera subarachnoidalblödning lång tid efter det att det akuta skedet är överståndet. Wieczorek (40) har funnit siderofager i CSV månader efter inträffad blödning. Författaren har hos vuxna funnit siderofager i CSV flera år efter säkerställd primär subarachnoidalblödning; i två fall efter 5 år.

Den cytologiska CSV-diagnostiken kan även utnyttjas för en grov skattning av en subarachnoidalblödnings ålder. Det anses att erythrofager uppträder i CSV ca 24 timmar efter inträffad blödning, att fagocyter innehållande diskreta hämosideringgranula och även hämatoidinkristaller påträffas på ca 6:e dagen och att hämosiderininlagringen i fagocyterna ökar under de följande veckorna (38, 40). Författaren har kunnat påvisa hämatoidinkristaller i ett fall på 10:e dagen efter en inträffad blödning, i ett fall på 12:e dagen, i övriga fall på 14:e dagen eller senare.

S U M M A R Y

A method för cytological examination of the cerebrospinal fluid (CSF) is described. A total and differential cell count was performed in a counting chamber by phase contrast microscopy. On CSF samples poor in cells a differential count was achieved in phase contrast microscope after concentration of the cells in a simple sedimentation chamber. CSF sediments were stained with May-Grünwald-Giemsa and studied under light microscope. The method was applied on CSF from neurologic "healthy" individuals and from patients with various neurological disorders.

1. The yield of the method after sedimentation was before staining $62.9\% \pm 11.2\%$ and after staining $21.5\% \pm 12.4\%$. The differential count obtained at phase contrast examination after sedimentation of the cells was reliable, i.e. it represented the true dispersion of the cells in CSF.

2. CSF invariably contained monocytoïds and lymphocytes. The monocytoïds at attachment on glass had a strong tendency to transform into many different forms, sometimes to very large cells, classified as macrophages. The monocytoïds were also capable of phagocytosis in vivo and in vitro, therefore regarded as reticuloendothelial cells.

3. Normal CSF in adults (38 individuals) was found to contain a mean number of 1.45 mononuclear cells per mm^3 with a range of 0.3 to 6.2 cells. The cells consisted of lymphocytes, median 86.5%, monocytoïds, median 10.5%, and of macrophages with a median value of 2%. Granulocytes were not found neither in the total cell count nor in the differential count.

4. Normal CSF in new born infants (13 individuals) contained a median number of 7.8 mononuclear cells per mm^3 with a range of 1.7 to 11.0 cells. Only in CSF from one infant were polynuclears found that could not be explained by contamination of peripheral blood (7 erythrocytes and 0.1 polynuclear cell per mm^3). Monocytoids were predominant, median value 63% and ranging from 32% to 85%. Lymphocytes occurred with a median value of 46%, range 15 - 66%. Most infants had no macrophages but an upper range of 9% was obtained. Erythrophagocytes or siderophagocytes were not found.

5. In CSF from patients with multiple sclerosis (69 cases) basophilic mononuclear cells were found in 67% at exacerbation of the disease and in 38% at remission. The basophilic mononuclears had different sizes and appearances. Many were highly active in DNA synthesis. Electron microscopic studies of CSF cells from one case of multiple sclerosis revealed a small amount of mononuclear cells containing mostly a low or moderately developed rough endoplasmatic reticulum. It was concluded that the majority of the basophilic mononuclear cells were immunologically active.

6. Consecutive cytological examinations of CSF were performed in 26 patients with presumed pale cerebral infarction, 66 with presumed hemorrhagic infarction, 16 with lobar hematoma not breaking through to the ventricular system, and 18 with cerebral infarction verified at necropsy.

A transitory outflow of polymorphonuclear neutrophilic leukocytes (PNL) was found in most of the patients with hemorrhagic infarction and lobar hematoma with a peak 3-4 days after onset. The strongest PNL reaction was recorded in CSF from patients with lobar hematoma. The majority of the

patients with pale infarction had no or only a few PNL. In the necropsy group the PNL reaction in the brain as well as in the CSF was stronger in patients with hemorrhagic infarction than in those with pale infarcts.

Most cases showed an increase of macrophages and monocytoids in CSF. In patients with presumed pale infarction the increase was smaller than in the group with presumed hemorrhagic infarction. The strongest reaction was recorded in the CSF from patients with lobar hematoma.

It was concluded, that the reaction of inflammatory cells in infarcted cerebral tissue and in lobar hematoma is reflected in the CSF. Examination of the white cells in CSF can therefore be used as an aid in the classification of stroke not accompanied by a gross hemorrhage in the CSF.

7. CSF samples from 62 neonates with clinical signs and symptoms consistent with cerebral disorder were examined. A follow-up study of the patients neurological and psychomotor development was carried out from 14 months to 3 years after delivery.

Cytological signs of hemorrhage (erythrophagocytes and/or siderophagocytes) were found in CSF from 30 neonates. The CSF was negative in this respect in 32 neonates. At the follow-up study 60% of the infants belonging to the first group presented symptoms of cerebral palsy, seizures or psychomotor retardation. On the other hand, 88% of the infants in the second group had developed normally.

REFERENSER

1. Fuchs, A. och Rosenthal, R.: Physikalisch-chemische, cytologische und anderweitige Untersuchungen der Cerebrospinalflüssigkeit. Wien. Med. Presse 45:2082-2087, 1904.
2. Schmid, W.: DNA-replication patterns of human chromosomes. Cytogenetics (Basel) 2:175-193, 1963.
3. Kjellin, K.G.: The CSF iron in patients with neurological diseases. Acta Neurol. Scand. 43:229-313, 1967.
4. Sayk, J.: Cytologie der Cerebrospinalflüssigkeit. Fischer, Jena. 1960.
5. Bammer, H.: Zur Tumorzell Diagnostik im Liquor cerebrospinalis. Dtsch Z Nervenheilk. 185:89-109, 1963.
6. Adams, R.D. och Sidman, R.L.: Introduction to Neuropathology, New York, McGraw-Hill, Inc., 1968, sid. 172-175.
7. Feigin, I.: The pathological changes produced by focal cerebral anoxia. Res. Publ. Assoc. Res. Nerv. Ment. Dis. 41:23-39, 1966.
8. Wiśniewski, H.: The pathogenesis of some cases of cerebral hemorrhage (a morphological study of the margins of haemorrhagic foci and areas of the brain distant from the hemorrhage). Acta Med. Pol. II: 4:379-390, 1961.

9. Jessen, H.: Cytologie du Liquide Céphalo-rachidien Normal chez l'Homme. Masson et Cie, Paris, 1936.
10. Kolar, O. och Zeman, W.: Spinal fluid cytomorphology: description of apparatus, technique and findings. Arch. Neurol. (Chicago) 18:44-51, 1968.
11. Widell, S.: On the cerebrospinal fluid in normal children and in patients with acute abacterial meningo-encephalitis. Berlingska boktryckeriet, Lund, 1958.
12. Bishoff, A.: Das Vorkommen von Plasmazellen im Liquor cerebrospinalis bei der Multiplen Sklerose. Dtsch. Z. Nervenheilk. 185:606-617, 1964.
13. Greger, J. och Wieczorek, V.: "Über das Vorkommen von Plasmazellen im Liquor cerebrospinalis bei neurologischen Erkrankungen. Wien. Z. Nervenheilk. 23:366-374, 1966.
14. Hanna, C. och Dowling, P.: Metabolism and proliferation of atypical lymphocytes in infectious mononucleosis. J. Arkansas Med. Soc. 63:453-454, 1967.
15. Gavosto, F.: Incorporation of thymidin labelled with tritium by circulating cells of infectious mononucleosis. Nature (London) 183:1691-1692, 1959.
16. Cooper, I.A. och Firkin, B.G.: Desoxyribonucleic acid synthesizing cells in the peripheral blood of patients with "auto-immune" disorders. Aust. Ann. Med. 14:142-145, 1965.

17. Cook, S.D. och Dowling, P.C.: Neurologic disorders associated with increased DNA synthesis in peripheral blood. Arch. Neurol. (Chicago) 19:583-590, 1968.
18. Behan, P.O., Geschwind, N., Lamarche, J.B., Lisak, R.P. och Kies, M.W.: Delayed hypersensitivity to encephalitogenic protein in disseminated encephalomyelitis. Lancet 2:1009-1012, 1968.
19. Dowling, P.C. och Cook, S.D.: Pattern of cellular and humoral events in experimental allergic encephalomyelitis. Neurology (Chicago) 18:953-962, 1968.
20. Asbury, A.K. och Arnason, B.G.: Experimental allergic neuritis. A radioautographic study. J. Neuropath. Exp. Neurol. 27:581-590, 1968.
21. Whitaker, J.N., Hirano, A., Cook, S.D. och Dowling, P.C.: The ultrastructure of circulating immunocytes in Guillain-Barré syndrom. Neurology (Chicago) 20:765-770, 1970.
22. Harris, T.N., Hummeler, K. och Harris, S.: Electron microscopic observations on antibody-producing lymph node cells. J. Exp. Med. 123:161-171, 1966.
23. Szenberg, A. och Cunningham, A.J.: DNA synthesis in the development of antibody-forming cells during early stages of immune response. Nature (London) 217:747-748, 1968.

24. Claude, H. och Verdun, M.: Syndrome méningé subaigu avec réaction leucocytaire aseptique du liquide céphalo-rachidien au cours des hémorragies cérébrales frustes sous-épendymo-corticales. Bull. Soc. Med. Hop. Paris 32:68-77, 1911.
25. Babinski, J. och Gendron, A.: Leucocytose du liquide céphalo-rachidien au cours du ramollissement de l'écorce cérébrale. Bull. Soc. Med. Hop. Paris 33:370-374, 1912.
26. Flandin, C., Gallot, H. och André, R.: Hémorrhagie cérébrale avec réaction méningée puriforme aseptique. Bull. Soc. Med. Hop. Paris 6:264-266, 1934.
27. Müller, W.: Ungewöhnliche Liquorbefunde bei Hirnblutungen und Erweichungen. Nervenarzt 11:358-361, 1938.
28. Townsend, S.R., Craig, R.L. och Braunstein, A.L.: Neutrophilic leukocytosis in spinal fluid associated with cerebral vascular accidents. Arch. Int. Med. (Chicago) 63:848-857, 1939.
29. Molle, W.E.: Leukocytosis in the cerebrospinal fluid in cerebral hemorrhage. Ohio State Med. J. 38:325-327, 1942.
30. Malosetti, H., Urioste, H. och Addiego, A.: Las pleocititis del liquido cefalorraquideo en los hematomas cerebrales. An Fac. Med. Montev. 47:89-93, 1962.

31. Cambier, J., Escourolle, R. och Girard, P.: Hématomes intracérébraux spontanés avec réaction inflammatoire du liquide céphalo-rachidien. *Presse Med.* 74:519-522, 1966.
32. Fischer, M. och Adams, R.D.: Observations on brain embolism with special reference to the mechanism of hemorrhagic infarction. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 10:92-94, 1951.
33. Olivarius, B.F.: *Apoplexia cerebri*. Munksgaard, Köpenhamn, 1964, sid. 181-201.
34. Amiel, C.: Hémorragies cérébrales intra-ventriculaires chez le prématuré. 2^e partie: Les éléments du diagnostic clinique. *Biol. neonat.* 7:57-75, 1964.
35. Hellström, B. och Kjellin, K.G.: The diagnostic value of spectrophotometry of the CSF in the newborn period. *Develop. Med. Child Neurol.* 13:789-798, 1971.
36. Mattews, W.F. och Frommeyer Jr, W.B.: The in vitro behavior of erythrocytes in human cerebrospinal fluid. *J. Lab. Clin. Med.* 45:508-515, 1955.
37. Bishoff, A. och Willi, H.: Ergebnisse der Liquorcyto-diagnostik beim Neugeborenen und Säugling. *Helv. Paediat. Acta* 1:24-35, 1962.
38. Rautenbach, M. och Steiniger, U.: Das Liquorzellbild Früh- und Neugeborener bei Subarachnoidalblutungen. *M Schr. Kinderheilk.* 114:54-57, 1966.

39. Rautenbach, M.: Perinatale Subarachnoidalblutungen im Liquorzellbild. Pädiat. prax. 7:13-16, 1968.
40. Wieczorek, V.: Liquorveränderungen bei Blutungen in den Subarachnoidalraum mit besonderer Berücksichtigung des Liquorzellbildes. Dtsch Z Nervenheilk 186:87-100, 1964.
41. Landell, N. och Sundblad L.: Liquorspektrofotometri som diagnostiskt hjälpmedel. Opusc. Med. 12:44-47, 1967.

